

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 776 926

(21) N° d'enregistrement national :

98 04323

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 38/17, A 61 K 47/48, 47/44

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 07.04.98.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 08.10.99 Bulletin 99/40.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

(50) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-
sement public à caractère scientifique et technologique
— FR, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE CNRS — FR et INSTITUT PASTEUR
DE LILLE — FR.

(72) Inventeur(s) : LE GAL FREDERIQUE ANNE,
GUILLET JEAN GERARD, GAHERY SEGARD
HANNE, GRAS MASSE HELENE, MELNYK OLEG et
TARTAR ANDRE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET HARLE ET PHELIP.

(54) LIPOPEPTIDES INDUCTEURS DE CYTOTOXICITE T LYMPHOCYTAIRE PORTANT AU MOINS UN EPITOPE T
AUXILIAIRE, ET LEURS UTILISATIONS POUR LA VACCINATION.

(57) Lipopeptides comprenant au moins un épitope T auxi-
liaire, au moins un épitope CTL et au moins un résidu lipidi-
que, caractérisés en ce que les épitopes et la partie lipidique
d'une part, et les épitopes d'autre part, sont séparés indé-
pendamment par des séquences d'acides aminés, appe-
lées espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides
aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant
l'hydrophilie de ces lipopeptides.

Utilisation de ces lipopeptides pour l'induction d'une ré-
ponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillo-
mavirus, de la p-53 du mélanome ou de la malaria

FR 2 776 926 - A1



La présente invention concerne des lipopeptides inducteurs de cytotoxicité T lymphocytaire et comprenant au moins un épitope T auxiliaire. Elle est en outre relative à l'utilisation de ces lipopeptides comme vaccin.

5 Il existe deux types de réponses immunitaires: la réponse humorale due aux anticorps, et la réponse cytotoxique due aux lymphocytes T CD8⁺.

Une réponse cytotoxique efficace requiert la présentation des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL), en association avec les molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC), mais aussi aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (HTL) en association avec les molécules de classe II du MHC.

10 L'utilisation de lipopeptides pour l'induction d'une réponse cytotoxique, c'est-à-dire la génération in vivo de lymphocytes T cytotoxiques a déjà été décrite. En particulier, la demande FR-90 15 870 (publication 2.670 787.) (Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur, INSERM) décrit des lipopeptides constitués d'une partie peptidique comprenant de 10 à 40 acides aminés et d'une partie lipidique qui peut être dérivée d'acides gras ou de groupements stéroïdes.

20 Ces lipopeptides montrent une bonne aptitude à induire une réponse cytotoxique. Il convenait cependant de les rendre capables d'induire également une réponse T auxiliaire, dont on sait l'importance pour l'induction et le maintien de la réponse cytotoxique.

A la connaissance des demandeurs, seul un article au nom de **VITIELLO et al.** (1995, J. Clin. Invest., 95, 341-349) a évoqué la possibilité de combiner sur une même molécule lipopeptidique un épitope CTL et un épitope induisant une réponse auxiliaire (épitope T-HELPER ou HTL).

30 La synthèse de deux lipopeptides est décrite dans cet article. Le premier est constitué de la partie 18-27 du core du virus de l'hépatite B, en tant qu'épitope CTL, de la partie 830-843 de la toxine tétanique, comme épitope T auxiliaire, et de deux chaînes palmitoyles. Les auteurs observent l'induction d'une cytotoxicité T-lymphocytaire.

Le second lipopeptide est constitué de l'épitope NP 147-155 du virus influenza murin, d'un épitope T auxiliaire et de chaînes lipidiques.

Néanmoins, les lipopeptides décrits dans cet article présentent une faible solubilité, due à la présence d'une part de la partie lipidique, et

d'autre part de motifs peptidiques hydrophobes. On notera à ce sujet que les produits décrits par ces auteurs sont stockés en solutions mères dans du DMSO concentré, et dilués extemporanément pour l'injection dans une solution aqueuse tamponnée.

5 Cette forte hydrophobicité rend difficile la fabrication de solutions de ces lipopeptides, et de ce fait limite considérablement les possibilités de stérilisation par filtration, qui est la méthode généralement utilisée en raison de sa facilité de mise en œuvre. Elle limite en outre fortement toute possibilité de caractérisation.

10 Le problème à résoudre consistait donc à réduire l'hydrophobicité des lipopeptides multi-épitoques tout en maintenant l'accessibilité à l'apprêtement nécessaire à l'acheminement du motif épitoque CTL vers le CMH de classe I.

La présente invention a pour objet de résoudre ce problème.

15 Les inventeurs ont maintenant trouvé qu'il était possible non seulement d'augmenter l'hydrophilie des molécules lipopeptidiques, mais aussi de limiter des interactions entre les différents épitoques, en introduisant des séquences hydrophiles d'acides aminés, appelées espaceurs, au sein de ces molécules.

20 La présente invention a donc pour objet des lipopeptides comprenant au moins un épitoque T auxiliaire, au moins un épitoque CTL et au moins un résidu lipidique caractérisés en ce que les épitoques et la partie lipidique d'une part, et les épitoques d'autre part, sont séparés indépendamment par des séquences d'acides aminés, appelées
25 espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide.

De manière préférentielle, les espaceurs sont accessibles à un apprêtement protéolytique par le protéasome, préalable à la libération du motif épitoque CTL. Cette accessibilité peut être mise en évidence comme
30 décrit par **OSSENDORP et al.** (1996, Immunity, 5, 115-124).

De manière préférentielle les espaceurs comprennent entre 1 et 10, préférentiellement entre 2 et 4 acides aminés, le nombre d'acides aminés étant suffisant pour obtenir des espaceurs globalement chargés en milieu neutre. Préférentiellement, au moins un des espaceurs comprend des
35 arginines et/ou des glycines. Les arginines présentent l'avantage d'être

chargées aux pH physiologiques, et de créer des sites de sensibilité particulière au clivage protéolytique lors de l'apprêtement des épitopes.

Les glycines présentent l'avantage de permettre l'introduction, au sein de la partie peptidique du lipopeptide, d'un site éventuel pour une
5 synthèse convergente par couplage de fragment.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux de l'invention, au moins un des espaceurs présente l'une des séquences suivantes:

10 **GLY ARG ou ARG GLY ARG.**

L'acide glutamique et/ou l'acide aspartique présentent également d'intéressantes propriétés applicables à la réalisation d'espaceurs selon la présente invention (accès à la dégradation protéolytique naturelle, et
15 introduction de fonctions carboxylates ionisées en milieu physiologique à pH neutre).

Ces acides aminés, rentrant dans la séquence des espaceurs, peuvent avantageusement être remplacés par leurs dérivés, ou par d'autres acides aminés fonctionnellement équivalents.

20 Ces acides aminés peuvent, au sein des espaceurs, être séparés par des acides aminés peu encombrés d'un point de vue chimique, c'est-à-dire présentant des chaînes latérales courtes, qui peuvent être, outre la glycine, l'alanine. La présence de ces acides aminés à chaîne courte facilite la protéolyse.

25 Une cystéine, ou une chaîne alkyle fonctionnalisée par un groupe thiol, capable de ménager un site possible de ligation chimique simple entre deux fragments peptidiques grâce à la formation de liaisons covalentes non peptidiques peut aussi être introduite dans l'espaceur. Il est ainsi possible de réaliser une liaison disulfure entre deux peptides
30 différents, comportant chacun une fonction thiol, ou une liaison thioéther, auquel cas l'un des deux peptides doit être fonctionnalisé par un halogénure d'alkyle.

Les deux peptides peuvent aussi être liés par formation d'un hétérocycle thiazolidine l'un des peptides amenant une fonction aldéhyde. Cette fonction aldéhyde peut être facilement et sélectivement générée sous forme d'un groupement alpha-oxo acyle, obtenu par oxydation périodique d'une sérine, d'une thréonine, ou d'une cystéine introduite en position N-terminale d'un fragment peptidique

Il est aussi possible d'associer les deux peptides en utilisant la réactivité des aldéhydes avec des bases faibles, ou des méthodes de ligation via la formation d'une oxime (par réaction entre une fonction aldéhyde et une fonction amino-oxyacétyle), d'une hydrazone (par réaction entre une fonction aldéhyde et une hydrazide ou une aryl-hydrazine). Ces réactions de base sont rappelées dans la revue de James Tam et Jane Spetzler. (Biomed. Pep., Prot. and Nucleic Acids (1995), 1, 123-132).

Une méthode de ligation consistant à générer une liaison hydrazone à partir d'une alkyl-hydrazine (générée par N-amination d'un précurseur amine) et d'un partenaire fonctionnalisé par un groupement alpha-oxo acyle a été récemment développée.

Les hydrazinopeptides sont synthétisés par N-amination selon Klinguer et al. (Tet. Lett. (1996), 37, 7259-7262). Cette méthodologie permet de transformer n'importe quelle fonction amine du peptide en fonction hydrazine. La fonction hydrazine peut ainsi être située en position N-terminale, ou sur la chaîne latérale d'un acide aminé situé à n'importe quel endroit de la séquence. La fonction amine transformée peut être une fonction amine alpha, epsilon d'une lysine ou de l'acide aminocaproïque, une fonction delta amino d'une ornithine, ou toute autre fonction amine primaire ou secondaire.

Les peptides aldéhydes sont générés comme décrits par Tam et Spetzler (Biomed. Pep., Prot. and Nucleic Acids (1995), 1, 123-132). Les résidus sérine, thréonine ou cystéine précurseurs du groupement alpha-

oxo acyle peuvent être situés en position N-terminale, ou sur toute fonction amine d'une chaîne latérale à partir du moment où ces résidus ne sont pas présents en position N-terminale dans les épitopes considérés.

Le groupement lipidique peut être porté indifféremment par l'hydrazinopeptide ou le peptide aldéhyde.

On entend, pour la compréhension de la présente invention, par épitope T auxiliaire, une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe II.

On entend par épitope CTL une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe I.

Les épitopes T auxiliaires capables de s'associer à plusieurs récepteurs HLA de classe II différents sont appelés épitopes auxiliaires multivalents (HTL multivalents).

Les lipopeptides selon la présente invention comprennent préférentiellement l'enchaînement de:

- une partie lipidique;
- un premier espaceur;
- un épitope T auxiliaire;
- un second espaceur; et
- un épitope CTL.

Ils peuvent aussi comprendre :

- une partie lipidique;
- un premier espaceur;
- un épitope T auxiliaire;
- un second espaceur;
- un épitope CTL;
- un troisième espaceur; et
- un second épitope CTL.

Les divers épitopes auxiliaires et CTL peuvent être présents dans des ordres différents dans l'enchaînement d'acides aminés. Ainsi, un

épitope auxiliaire peut être compris entre deux épitopes CTL, desquels il sera séparé par deux espaceurs.

La partie lipidique du lipopeptide est avantageusement obtenue par addition d'un motif lipidique sur une fonction alpha aminée d'un peptide ou sur une fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé de la partie peptidique, telle qu'une fonction epsilon amine ou thiol. Elle peut comprendre une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras en C₁₀ à C₂₀, éventuellement ramifiées ou insaturées ou un dérivé d'un stéroïde.

De manière avantageuse, la partie lipidique comprend au moins deux chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C₁₀ à C₂₀ liées aussi entre elles par l'intermédiaire d'un ou plusieurs acides aminés. La partie lipidique peut ainsi être constituée de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂ alpha et epsilon, d'une lysine.

La partie lipidique peut aussi être constituée de, ou comprendre, un résidu d'acide palmitique, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, de pimélaute ou de trimélaute.

La partie non lipidique comprend quant à elle entre 15 et 100, et préférentiellement entre 15 et 50 acides aminés. Le nombre d'acides aminés dépend du nombre d'épitopes constituant la partie non lipidique du lipopeptide, et de leurs tailles.

De manière avantageuse, l'épitope T auxiliaire est un épitope capable de s'associer à plusieurs récepteurs HLA de classe II différents, c'est-à-dire un épitope multivalent. Il est préférentiellement l'épitope auxiliaire constitué par le peptide 830-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

QYIKANSKFIGITE

La glutamine (Q) de cette séquence peut éventuellement être acétylée.

D'autres épitopes HTL multivalents peuvent être l'épitope multivalent de l'hémagglutinine (PREVOST-BLONDEL et al. 1995, J. Virol., vol.62, n°12, pages 8046-8055) ou encore l'épitope PADRE (ALEXANDER et al., 1994, Immunity, 1, 751).

L'épitope CTL peut quant à lui être tout épitope capable d'activer des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺.

Il est préférentiellement un épitope CTL d'une protéine présentée par une cellule tumorale et en particulier par un mélanome, d'une protéine du VIH, du virus de l'hépatite B (VHB) ou du papillomavirus, ou encore de la protéine p53.

Il peut être en particulier l'un des épitopes suivants:

- épitopes de la protéine BCR-ABL, résultant de la translocation BCR- Abelson (leucémie myéloïde chronique) tels que mentionnés dans le tableau 1.

- épitopes de la protéine p53, tels que ceux mentionnés dans le tableau 2.

Les épitopes de la protéine p53 peuvent en outre être pris dans les séquences 25-35, 63-73, 129-156, 149-156, 187-205, 187-234, 226-264, ou 249-264 de cette protéine.

- épitopes des protéines E₆ ou E₇ du papillomavirus humain (VPH), tels que ceux mentionnés dans le tableau 3.

- épitopes de protéines du virus VIH-1 tels que ceux mentionnés dans le tableau 4,

- épitopes du mélanome ou d'autres tumeurs, tels que ceux mentionnés dans les tableaux 5, 6 et 7 et en particulier épitopes de l'antigène melan-A/mart-1 du mélanome.

D'autres épitopes CTL plurivalents présentant une capacité d'association avec des HLA de classe I peuvent être ceux compris dans le peptide 43-57 de HPV (GQAEPDRAHNIVTF) qui contient des épitopes HLA A2, A24, B7 et B18.

Les épitopes CTL peuvent encore être ceux d'antigènes parasitaires, et en particulier ceux d'une protéine du stade intra-hépatocytaire de *Plasmodium falciparum*.

La liaison entre la partie lipidique et la partie non lipidique est préférentiellement effectuée par l'intermédiaire du groupement ε -NH₂ du premier acide aminé de la partie non lipidique. Elle peut néanmoins être effectuée par tout autre moyen, et en particulier par le groupement α -NH₂ d'une lysine.

Les lipopeptides selon la présente invention peuvent être administrés aux patients à traiter, en particulier aux personnes à vacciner, dilués dans un solvant adéquat, tel que par exemple un tampon physiologiquement acceptable. Ils peuvent néanmoins être mis sous une
5 forme galénique compatible avec une administration par voie parentérale, sublinguale, intrapulmonaire ou transdermique.

Ils peuvent être administrés par tout mode d'administration permettant une action efficace. Ce mode sera choisi en fonction de la maladie à traiter. A titre non limitatif, les lipopeptides peuvent en particulier
10 être administrés par injection ou par voie sublinguale.

Un autre objet de la présente invention est donc l'utilisation de ces lipopeptides pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin, préventif ou curatif, pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique, et en particulier, pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre de
15 cancers tels que le mélanome, des virus VIH et VHB, des papillomavirus, de la p53 ou de la malaria.

La présente invention a encore pour objet une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une quantité pharmacologiquement active d'un ou plusieurs des lipopeptides décrits ci-
20 dessus, ainsi que des excipients pharmaceutiquement compatibles.

On notera enfin que les épitopes CTL décrits dans la présente demande constituent en eux-mêmes des objets de la présente invention.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent.

25 La figure 1 illustre la reconnaissance des lipopeptides monopalmitoyle et dipalmitoyle selon l'invention, comprenant l'épitope Mart 27-35, par une lignée de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques dudit épitope dans un test Elispot-interféron gamma (IFN- γ).

Les figures 2A et 2B illustrent la reconnaissance des lipopeptides mentionnés pour la figure 1, par deux clones de lymphocytes infiltrants de
30 mélanomes, respectivement LT8 et LT12, spécifiques de l'épitope Mart 27-35.

La figure 3 représente la formule d'un lipopeptide comprenant une liaison hydrazone.

Exemple 1 Synthèse de lipopeptides dipalmitoylés avec et sans espaceur, et propriétés physico-chimiques

1. Synthèses des lipopeptides

5 La série des trois lipopeptides suivants a été synthétisée.

Lipopeptide N° 1

Pam-K(Pam)-SS-QYIKANSKFIGITE-AAA-AAGIGILTV

10

Lipopeptide n°2

Pam-K(Pam)-SS-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

15

Lipopeptide n°3

Pam-K(Pam)-GR-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

20 Ces lipopeptides comprennent une extrémité lipidique constituée de deux résidus palmitoyl (Pam) liés au groupement NH₂ d'une lysine, l'épitope auxiliaire de la toxine tétanique (peptide 830-843) et un épitope CTL reconnu dans mart-1 par le récepteur HLA A2.1. L'épitope Hbc 18-27 décrit par VITIELLO et al. (cité supra) est aussi reconnu par HLA A2.1, et présente une hydrophobicité similaire au motif choisi dans la série de lipopeptides précitée.

25 La différence réside dans les séquences d'acides aminés comprises d'une part entre la partie lipidique et l'épitope auxiliaire et d'autre part, entre l'épitope auxiliaire et l'épitope CTL. Cette série a été réalisée pour évaluer la possibilité d'obtenir sous forme purifiée et caractérisable des produits définis par référence au produit selon VITIELLO et comportant comme

30

35 Dans le lipopeptide n° 1, ces séquences sont identiques à celles du lipopeptide décrit par VITIELLO et al.. Deux sérines sont insérées entre la

partie lipidique et l'épitope auxiliaire. Trois alanines sont quant à elles placées entre l'épitope auxiliaire et l'épitope CTL.

Le lipopeptide n°2 comprend les séquences SS (séryl-séryl) et ARG - GLY - ARG.

5

Le lipopeptide n° 3 est construit selon la présente invention, et comprend des espaceurs hydrophiles présentant respectivement les séquences GLY-ARG et ARG-GLY-ARG.

10

La synthèse a été réalisée selon des procédures « standards » utilisées en phase solide selon la stratégie Boc-benzyle décrite par Merrifield (1963 J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; 1986 Science 232, 341-347). L'introduction en position N-terminale d'une di-Boc Lysine permet, après déprotection de la peptidyl résine, l'introduction simultanée des deux chaînes palmitoyle, pour obtenir le dérivé attendu.

15

2. Purification et propriétés physico-chimiques des lipopeptides.

20

Le lipopeptide n° 1 est pratiquement insoluble dans l'eau, ou dans un mélange DMSO/eau 10% V/V. Il s'avère non purifiable, non caractérisable par HPLC selon des méthodes résolutes, en raison de la formation d'agrégats. L'identité de ce lipopeptide a pu être confirmée par mesure de la masse par spectrométrie PDMS-TOF, réalisée sur le produit brut, immédiatement après le clivage terminal par l'acide fluorhydrique et avant lyophilisation. Le produit devient totalement insoluble dans l'eau après lyophilisation.

25

La mesure de la masse par spectrométrie PDMS-TOF du lipopeptide n°2 est possible, et confirme que le produit attendu a bien été obtenu. Cependant, ce produit adopte dans l'eau un comportement voisin du lipopeptide n°1, et ne peut donc être correctement analysé.

30

Le lipopeptide n° 3 est soluble dans l'acide acétique à 80%. Il peut être stérilisable par filtration sur un microfiltre de 0,22 µm. Il peut être en outre dissous dans une solution DMSO/eau 10% V/V. La mesure de la masse par spectrométrie PDMS-TOF confirme la présence du produit

35

attendu. Le produit s'avère purifiable après injection d'une solution concentrée dans le DMSO, sur colonne Vydac C4, à 60°C, en utilisant un gradient d'acétonitrile, en présence du contre-ion TFA. Le produit est caractérisable par HPLC selon plusieurs méthodes résolutives conventionnelles, sur colonnes Vydac C4, Zorbax C3, Zorbax CN, Zorbax C1, à 60°C, à l'aide de gradients d'acétonitrile en présence d'un contre-ion TFA, ou en utilisant un modificateur organique, tel que l'isopropanol ou le butanol en isocratique.

Le trifluoroacétate du lipopeptide n°3 est soluble dans le DMSO (20-25 mg/mL), et reste soluble après dilution par de l'eau (DMSO 10%). L'échange du contre-ion trifluoroacétate pour un contre-ion acétate peut être réalisé par RP-HPLC sur une colonne C4: le produit dissous dans le DMSO à 80% est injecté sur la colonne équilibrée par le solvant A (acide acétique à 5% dans l'eau). Après élimination des produits non retenus (contre-ions TFA, sels), le produit est élué par l'aide d'un gradient du solvant A vers le solvant B (acétonitrile 80% - acide acétique à 5% - eau 15%).

L'acétate présente une solubilité comparable à celle du trifluoroacétate. Il a été utilisé pour immuniser des souris transgéniques exprimant HLA-A2, et s'est avéré capable d'induire une réponse CTL satisfaisante en l'absence d'adjuvant d'immunisation.

Ces résultats montrent donc que l'insertion d'espaceur hydrophile entre la partie lipidique et l'épitope auxiliaire d'une part, et d'autre part entre l'épitope auxiliaire et l'épitope CTL permet de solubiliser le lipopeptide, ce qui n'est pas le cas quand les séquences d'acides aminés sont différentes.

EXEMPLE 2: Synthèse de lipopeptides monopalmitoylés selon l'invention, et propriétés physico-chimiques:

Une deuxième série de lipopeptides a été réalisée pour évaluer la possibilité d'obtenir sous forme purifiée et caractérisable des produits comportant cette fois-ci une seule chaîne palmitoyle; l'espaceur central employé est introduit selon la présente invention (-RGR- pour arginyl-glycyl-arginyl-), tandis que l'espaceur -SS-(seryl-seryl-) de VITIELLO est

maintenu ou remplacé pour l'un ou les deux espaceurs selon la présente invention.

L'introduction en position N-terminale d'une alpha-Fmoc, epsilon Boc Lysine permet, après déprotection sélective du groupe Boc, l'introduction d'une seule chaîne palmitoyle, pour obtenir le produit suivant:

Lipopeptide n°4:

H-K(Pam)-SS-QYIKANSKFIGITE-RGR-AAGIGILTV

Ce produit s'avère difficilement purifiable. Il n'est soluble en milieu aqueux qu'en présence de DMSO. Un profil chromatographique peut être obtenu par RP-HPLC uniquement sur une colonne de type C1 en utilisant un système solvant « standard » (acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique), selon une méthode peu résolutive, qui ne permet pas de garantir la réelle pureté du produit.

Le lipopeptide n°5 suivant, a été synthétisé.

Lipopeptide n°5:

H-K(Pam)-GR-QYIKANSKFIGITE-RGR- AAGIGILTV

Ce produit a été obtenu comme le lipopeptide n°4 par acylation sélective de la fonction epsilon NH₂ de la lysine N-terminale.

Ce lipopeptide n°5 satisfait au critère de purification et de caractérisation classiques.

Cette comparaison entre les lipopeptides n°4 et n°5, qui sont des lipopeptides monopalmitoyles, confirme les résultats obtenus sur les lipopeptides dipalmitoyles.

Les lipopeptides 3 et 5 ont été les seuls à répondre aux critères définis (accès à une méthode de purification et à des critères analytiques résolutifs). Leur étude a été poursuivie par l'étude de leur reconnaissance par divers types cellulaires. Les résultats de cette étude figurent dans l'exemple 3.

Exemple 3. Activité biologique de lipopeptides dipalmitoyle et monopalmitoyle selon l'invention contenant un épitope CTL mélanome

5 Le lipopeptide dipalmitoyle n°3 et le lipopeptide monopalmitoyle n°5 synthétisés comme indiqué respectivement dans les exemples 1 et 2 ont été testés.

10 **1°) Etude de la reconnaissance des lipopeptides mono- et dipalm-Mart 27-35 par une lignée de lymphocytes T cytotoxiques humains spécifiques de MART 27-35 dans un test Elispot Interféron- γ (IFN- γ).**

15 **a) Matériels et méthodes:**

La lignée L28.3 de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de MART 27-35 a été obtenue à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de donneur sain HLA-A2⁺. Le protocole d'induction de ces cellules effectrices à partir de PBMC de donneur naïf a été décrit par Ostankovitch et al. (Int. J. Cancer, 1997, 72, 987-994).

20 **Méthode du test Elispot:**

Dans ce test les cellules cibles sont des PBMC autologues non stimulées (naïfs).

25 50 μ l/puits d'anticorps murin anti-IFN γ humain dilué dans du tampon PBS à une concentration de 4 μ g/ml sont incubés dans des plaques de 96 puits à fond de nitrocellulose pendant la nuit à 4°C en chambre humide.

30 Les PBMC sont décongelées, maintenues au repos durant 2 heures dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum humain AB (SAB) à 37°C dans une atmosphère, contenant 5% de CO₂. Elles sont ensuite incubées durant une nuit avec les peptides à tester à différentes concentrations (10, 5 et 1 μ g/ml).

35 Les puits sont lavés avec du PBS puis saturés avec du milieu RPMI contenant 10% de SAB, pendant 2 heures à 37°C.

Les cellules effectrices sont ensuite distribuées dans les plaques de 96 puits préalablement incubées avec l'anti-IFN γ à raison de 20.000 cellules par puits dans 200 μ l final et en présence des PBMC autologues stimulées avec un rapport effecteur: cible (E : T) de 1:1 . La
5 phytohémmagglutinine (PHA) à la concentration de 4 μ g/ml et le phorbol 12-méristate 13-acétate (PMA)-ionomycine (150 et 500 ng/ml respectivement) sont utilisées à titre de témoins positifs.

Après 20 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO $_2$, les puits sont lavés 5 fois avec du PBS puis 1 fois
10 avec de l'eau distillée, puis sont incubés toute la nuit à 4°C avec 100 μ l/puits d'anticorps de lapin anti-IFN γ humain dilué au 1/250ème dans du RPMI contenant 10% de SAB. Les puits sont ensuite lavés 5 fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20, puis incubés pendant 2 heures à 37°C avec 100 μ l d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin
15 biotinylés dilués au 1/500ème dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20 et 1% de BSA (sérum albumine bovine).

Les puits sont à nouveau lavés cinq fois avec du PBS-Tween puis incubés pendant 1 heure à 37°C avec 100 μ l d'ExtrAvidine-Phosphatase Alcaline diluée au 1/600ème dans du PBS-Tween-BSA 1%.

Après quatre lavages en PBS-Tween, les puits sont incubés avec
20 100 μ l de substrat de révélation (Alkaline phosphatase conjugate substrate kit, Réf. 170-6432. Biorad). Les puits sont ensuite lavés avec de l'eau distillée et séchés avant la lecture des résultats au stéréomicroscope.

25 **b) Résultats:**

La figure 1 illustre les résultats obtenus.

Les deux lipopeptides de MART 27-35 stimulent de façon spécifique la sécrétion d'IFN γ par la lignée de CTLs anti-MART 27-35. Ils sont donc
30 présentés par les PBMC et reconnus par les CTLs d'une façon comparable au peptide nominal MART 27-35.

2) Etude de la reconnaissance des lipopeptides mono- et dipalmitoylé MART 27-35 par deux clones de lymphocytes infiltrants de mélanomes humains spécifiques de MART 27-35, par un test de cytotoxicité par relargage de ^{51}Cr .

5

a) Matériel et méthode:

LT 8 et LT 12 sont deux clones HLA-A2* obtenus par la restimulation de lymphocytes infiltrants de mélanome (TILs), qui reconnaissent spécifiquement le peptide MART 27-35.

Les cellules cibles utilisées dans ce test sont des cellules humaines HLA-A2* de type T2. Ces cellules sont dépourvues de transporteurs de peptide et ne présentent donc que les peptides exogènes sur leurs molécules de classe I libres.

Dans ce test, les cellules cibles sont incubées durant une nuit avec le peptide à tester à raison de $4 \mu\text{g}/10^6$ cellules, dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 à 37°C . Elles sont ensuite incubées pendant une heure à 37°C avec $100 \mu\text{Ci}$ de chromate de sodium (^{51}Cr). Les cellules cibles sont ensuite lavées deux fois dans du sérum physiologique contenant 5% de sérum foetal de veau (SVF), reprises dans du milieu RPMI 5% SVF et distribuées dans des plaques de 96 puits à raison de 3000 ou 5000 cellules par puits dans $100 \mu\text{l}$.

Les cellules effectrices (LT8 et LT12) ont ensuite été ajoutées dans $100 \mu\text{l}$ du même milieu avec un rapport effecteur : cible de 10:1.

Le relargage de chrome obtenu pendant l'incubation de 4 heures à 37°C a été mesuré sur un compteur gamma. Le pourcentage de lyse est déterminé par la formule suivante (R = relargage):

% de lyse (R . expérimental - R . spontané/ R . total- R .spontané) x 100.

30

b) Résultats:

Les figures 2A et 2B illustrent les résultats obtenus.

Les deux lipopeptides de MART 27-35, mono et dipalmitique, sont reconnus par des cellules effectrices humaines, provenant de mélanomes et spécifiques du peptide MART 27-35. Ces deux types de lipopeptides

35

sont reconnus de façon similaire, et à un niveau au moins comparable au peptide original (MART 27-35) compte-tenu que les cellules cibles ont été exposées à la même concentration finale de peptides alors que la masse molaire des lipopeptides est environ 5 fois plus élevée que celle du peptide MART 27-35.

EXEMPLE 4 : Préparation d'un lipopeptide comprenant une liaison hydrazone.

L'hydrazinopeptide et le peptide aldéhyde présentent les formules suivantes:

hydrazinopeptide : $K(NH_2)ILKEPVHGV-OH$ / épitope MHC I-POL HIV-1

peptide aldéhyde : $CHOCO-RTPPAYRPPNAPILK(Pam)-NH_2$ / épitope MHC II-HBVc

Le peptide aldéhyde comprend l'épitope 128-140 de la protéine core du virus de l'hépatite B (HBVc) tel que décrit par **MILICH et al.** (1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1610-1614).

16 mg (12 μ mol) d'hydrazinopeptide et 15 mg (7 μ mol) de peptide aldéhyde sont dissous dans 4 ml de tampon citrate/phosphate 0,01M pH 5,4 et 1 ml de DMSO. Le pH est ajusté à 5,4 avec Na_2HPO_4 0,2M.

Après 24h, le milieu est dilué avec 5 ml d'acide acétique et purifié sur une colonne C18 (15x500 mm). Eluant A : TFA 0,05% dans H_2O , Eluant B : TFA 0,05% dans CH_3CN/H_2O (80/20). Gradient 0-40%B en 10 min. puis 40-100%B en 60min. Les fractions pures sont collectées et lyophilisées. 4,9 mg de produit pur est obtenu (rendement 22%).

La formule du produit final est représentée sur la figure 3.

TABLEAU 1 : Epitopes de BCR-ABL

Peptide	Séquence	Fixation au HLA
247-255	EDAELNPRF	B44
488-496	SELDLEKGL	B44
768-776	DELEAVPNI	B44
901-934 b2a2	KEDALQRPV	B44
902-935 b2a2	EDALQRPVA	B44
986-994	GEKLRVLGY	B44
1176-1184	EDTMEVEEF	B44
1252-1260	MEYLEKKNF	B44
1691-1699	NEEAADDEVF	B44
49-57	VNQERFRMI	B8
580-588	LFQKLASQL	B8
722-730	ARKLRHVFL	B8
786-794	ALKIKISQI	B8
886-893	CVKLQTVH	B8
928-936 b3a2	KALQRPVAS	B8
1830-1838	GAKTKATSL	B8
1975-1983	IQQMRNKFA	B8
1977-1984	QMRNKFAF	B8
252-260	NPRFLKDNL	B7
329-338	TPDCSSNENL	B7
693-701	TPRRQSMIV	B7
1058-1066	SPGQRSISL	B7
1196-1205	HPNLVQLLGV	B7
1560-1569	SPKPSNGAGV	B7
1717-1725	KPLRRQVTV	B7
1878-1884	SPAPVPSTL	B7
36-44	ERCKASIRR	B27
71-79	DRQRWGFERR	B27
575-583	QRVGDLFQK	B27
834-842	FRVHSRNGK	B27
642-650	LLYKPVDRV	A2
684-692	FLSSINEEI	A2
708-716	QLLKDSFMV	A2
714-722	FMVELVEGA	A2
817-825	KLSEQESLL	A2
881-889	MLTNSCVKL	A2
908-917	GLYGFLNVIV	A2
912-920	FLNVTVHSA	A2
1240-1248	VLLYMATQI	A2
1903-1911	FIPLISTRV	A2
1932-1940	VVLDSTEAL	A2
50-58	NQERFRMIY	A1
223-231	VGDA SRPPY	A1
549-558	KVPELYEIHK	A3/A11
583-591	KLASQLGVY	A3/A11
715-724	MVELVEGARK	A3/A11
916-923	IVHSATGFK	A3/A11
920-928 b3a2	ATGFKQSSK	A3/A11
924-932 b3a2	KQSSKALQR	A3/A11
1156-1165	EVYEGVWKKY	A3/A11
1311-1320	SLAYNKFSIK	A3/A11
1499-1509	NLFSALIKK	A3/A11
1724-1734	TVAPASGLPHK	A3/A11
1905-1914	LISTRVSLRK	A3/A11
1922-1930	RIASGAITK	A3/A11

TABLEAU 2 - Epitopes de la p53

	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A1:</u>
	RVEGNLARVEY (196-205)
5	GSDCTTIHY (226-234)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A2:</u>
	LLPENNVLSPL (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
	RMPEAAPRV
10	ALNKMFCQL (129-137)
	STPPPGTRV (149-157)
	GLAPPQHLIRV (187-197)
	LLGRNSFEV (264-272)
	PLDGEYFTL (322-330)
15	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A3:</u>
	RVRAMAIYK (156-164)
	RRTEENLR (282-290)
	ELPPGSTKR (298-306)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B7:</u>
20	LPENNVLSPL (26-35)
	APRMPEAAPPV (63-73)
	APRMPEAAPRV
	APPQHLIRV (189-197)
	RPILTIITL (249-257)
25	KPLDGETYFTL (321-330)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B8:</u>
	CQLAKTCPV (135-143)
	GLAPPQHIL (187-195)
	NTFRHSVVV (210-218)
30	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B51:</u>
	LLPENNVLSPL (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
	LIRVEGNLRV (194-203)

TABLEAU 35 Epitopes des protéines E₆ et E₇

YMLDLQPETT (E7 11-20)

LLMGTLGIV (E7 82-90)

10 TLGIVCPI (E7 86-93)

TIHDIILECV (E6 29-38)

KLPQLCTEL (E6 18-26)

RPPKLPQL (E6 8-15)

ISEYRHYCY (E6 80-88)

15 QAEPDRAHY (E7 44-52)

EPDRAHYNIV (E7 46-55)

TABLEAU 4 : Epitopes du virus VIH-1

20

HLA-A1

Qef 96-106: GLEGLIHSQRR
 Qef 121-128: FPDWQNYT
 Qef 137-145: LTFGWCYKL
 Qef 184-191: RFDSRLAF
 Qef 195-202: ARELHPEY

HLA-A2

Gp120 121-129: KLTPLCVTL
 P17 77-85: SLYNTVATL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 275-285: VLDVGDAYFSV
 RT 346-354: KYQYMDDL
 RT 368-376: KIEELRQHL
 RT 376-387: LLRWGLTTPDK
 RT 476-484: ILKEPVHGV
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 RT 683-692: ELVNQDEQL
 Nef 136-145: PLTFGWCFKL
 Nef 180-189: VLQWRFD SRL
 Nef 190-198: ALHHVAREL
 Gp41 818-826: SLLNATVDI
 P24 185-193: DLNTMLNTV
 RT 346-354: VIYQYMDDL
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 Pro 143-152: VLVGPTPVNI
 (Gp120 37-44: TVYGVVPV
 (Gp120 115-122: SLKPCVKL
 (Gp120 313-321: RIQRGPGR
 (Gp120 197-205: TLTSNTSV
 (Gp120 428-435: FINMWQEV
 (Gp41 836-844: VYQGAYRAI
 (p24 219-228: HAGPIAPGQM
 (p15 422-431: QMKDCTERQA
 (p15 448-456: FLQSRPETA
 (RT 681-691: ESELVNQHEG

HLA-A3

P17 18-26: KIRLRPGCK
 P17 20-28: RLRPGGKKK
 RT 200-210: ALVEICTEMEK
 RT 325-333: AIFQSSMTK
 RT 353-365: DLEIGQHRTK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Gp120 37-46: TVYGVVPVVK
 Gp41 775-783: RLRDLLLVTR
 P17 18-26: KIRLRPGCK

HLA-A11

RT 325-333: AIFQSSMTK
 RT 507-517: QNQEPPFKNLK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Nef 84-92: AVDLSHFLK
 p24 349-359: ACQVGGPGHK
 P17 83-91: ATLYCVHQR

Tableau 4 (suite)

21

HLA-A24 (A9)

Gp120 52-61: LFCASDAKAY
 Gp41 591-598: YLKDQQLL
 ou 590-597: RYLKDQQLL
 (RT 484-492: VYYDPSKDL
 (RT 508-516: IYQEPFKNL
 (RT 681-691: ESELVNQIEG

HLA-A25 (A10)

P24 203-212: ETINEEAAEW

HLA-A26 (A10)

P24 167-175: EVTPMFSAL

HLA-A30 (A19)

(Gp41 845-852: RAIRHIPRR

HLA-A31 (A19)

Gp41 775-785: RLRDLLLLIVTR

HLA-A32 (A19)

Gp120 424-432: RIKQHNMW
 Gp41 774-785: HRLRDLLLL
 RT 559-568: PIKETWETW

HLA-A33 (A19)

(P24 266-275: IILGLNKIVR

HLA-B7

RT 699-707: YLAWVPAHK
 Nef 68-77: FPVTQVPLR
 Nef 128-137: TPGPGVRYPL
 Gp120 303-312: RPNNNTRKSI
 Gp41 848-856: IPRRIRQGL
 RT 699-707: YLAWVPAHK

HLA-B3

Gp120 2-10: RVKEYQHL
 P17 24-32: GCKKKYKLK
 Nef 90-97: FLKEKGGL
 P24 259-267: GEYKRIVV
 Gp41 591-598: YLKDQQLL
 (Gp41 849-856: PRRIRQGL
 ou 851-859: RIRQGLERIL
 (P24 329-337: DCKTILKAL
 (RT 185-193: GPKVKQWPL
 (Nef 182-189: EWRFD SRL

HLA-B14

Gp41 589-597: ERYLKDQQL
 P24 298-306: DRFYKTLRA
 (P24 183-191 ? : DLNTMLNTV
 (p24 304-313: LRAEQASVQEV
 (p24 305-313: RAEQASVQEV

HLA-B18

Nef 135-143: YPLTFGWCV
 Nef 135-143: YPLTFGWCF

Tableau 4 (suite)

22

HLA-B27

P24 263-272: KRWT~~L~~GLNK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Nef 134-141: RYPLTFGW
 ou 133-141: YPLTFGW
 Gp41 589-597: ERYLKDQQL
 (Gp41 791-800: GRRGWEALKY)

HLA-B35

Gp120 78-86: DPNPQEVVL
 Gp120 257-265: RPYVSTQLL
 RT 285-294: VPLDKDFRKY
 RT 323-331: SPAIFQSSM
 RT 342-350: NPDI~~V~~TYQY (consensus clade B)
 RT 460-468: TPLTEEAEL
 RT 598-608: EPIVGAETFY
 Nef 68-76: FPVRPQVPL
 Nef 74-81: VPLRPM~~T~~Y
 Gp41 611-619: TAVPWNASW
 Gp120 42-52: VPMVKEATTTL
 P17 124-132: NSSQVSQNY (consensus clade B)
 P24 254-262: PPIPVGEIY (consensus clade B)

HLA-B37

Nef 120-128: YFPDWQNYT

HLA-B44 (B12)

P24 178-186: SEGATPQDL
 (P24 175-184: LESGATPQDL)

HLA-B51 (B5)

Gp41 562-570: RAIEAQQHL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 209-217: EKEGKISKI
 RT 295-302: TAFTPSI

HLA-B52 (B5)

Nef 190-198: AFHHVAREL

HLA-B55 (B22)

Gp120 42-51: VPMVKEATTTL

HLA-B57 et B58 (B17)

P24 240-249: TSLTQEIQIW
 Nef 116-125: HTQGYFPDWQ
 ou 116-124: HTQGYFPDW
 Nef 120-128: YFPDWQN
 (P24 147-155: ISPRTLNAW
 (P24 164-172: FSPEVIPMF)

HLA-Bw62 (B15)

P17 20-29: RLRPGGKKKY
 P24 268-277: LGLNKIVRMY
 RT 427-438: LVGKLNWASQIY
 Nef 84-91: AVDL~~S~~HFL
 Nef 117-127: TQGYFPDWQNY

Tableau 4(suite)

23

HLA-Cw4

gp120 380-388: SFNCGGEFF

HLA-Cw8RT 663-672: VTDSQYALGI
P24 305-313: RAEQASQEV
Nef 82-91: KAA~~L~~DL~~S~~HPLHLA-Cw?

P24 308-316: QATQEVKNV

TABLEAU 5 - Epitopes de Mélanome humain

Gene/protéine	MHC restriction	Peptide	Position des acides aminés
Tyrosinase	HLA-A2	MLLAVLYCL	1-9
	HLA-A2	YMNGTMSQV	369-377
		YMDGTMSQV	
	HLA-A24	AFLPWHRLF	206-214
	HLA-B44	SEIWRDIDF	192-200
Pmel17 ^{gp100}	HLA-A2	KTWGQYWQV	154-162
	HLA-A2	AMLGHTHTMEV	177-186
	HLA-A2	MLGHTHTMEV	178-186
	HLA-A2	ITDQVPFSV	209-217
	HLA-A2	YLEPGPVTA	280-288
	HLA-A2	LLDGTATLRL	457-466
	HLA-A2	VLYRYGSFSV	476-485
	HLA-A2	SLADTNSLAV	570-579
	HLA-A3	ALLAVGATK	17-25
Melan-A ^{MART-1}	HLA-A2	(E)AAGIGILTV	26(7)-35
	HLA-A2	ILTVILGVL	32-40
gp ^{75TRP-1}	HLA-A31	MSLQRQFLR	
TRP-2	HLA-A31	LLGPGRPYR	197-205

TABLEAU 6: Epitopes de tumeurs résultant de mutations

Gene/proteine	Tumeur	MHC Restriction	Peptide	Position des acides aminés
MUM-1	Mélanome	HLA-B44	EEKLIIVLF	30-38
CDK4	Mélanome	HLA-A2	ACDPHSGHFV	23-32
β -catenine	Mélanome	HLA-A24	SYLDSGIHF	29-37
CASP-8	carcinome squameux de la tête et du cou	HLA-B35	FPSDSWCYF	476-484

TABLEAU 7**Antigènes communs à diverses tumeurs**

Gene	tissu où a lieu l'expression normale	MHC restriction	Peptide antigénique	Position des acides aminés
MAGE-1	testicules	HLA-A1	EADPTGHSY	161-169
		HLA-Cw16	SAYGEPRKL	230-238
MAGE-3	testicules	HLA-A1	EVDPIGHLY	168-176
		HLA-A2	FLWGPRLV	271-279
		HLA-B44	MEVDPIGHLY	167-176
BAGE	testicules	HLA-Cw16	AARAVFLAL	2-10
GAGE-1/2	testicules	HLA-Cw6	YRPRPRRY	9-16
RAGE-1	rétine	HLA-B7	SPSSNRIRNT	11-20
GnTV	aucun	HLA-A2	VLPDVFIRC	38-64

REVENDEICATIONS

1. Lipopeptide comprenant au moins un épitope T auxiliaire, au moins un épitope CTL et au moins un résidu lipidique, caractérisé en ce que les épitopes et la partie lipidique d'une part, et les épitopes d'autre
5 part, sont séparés indépendamment par des séquences d'acides aminés, appelées espaceurs, comprenant des enchaînements d'acides aminés globalement chargés en milieu neutre, assurant l'hydrophilie du lipopeptide.

2. Lipopeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que les
10 espaceurs sont globalement hydrophiles et présentent entre 1 et 10 acides aminés.

3. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'au moins l'un des espaceurs comprend entre 1 et 10, glycines et/ou arginines.

4. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en
15 ce qu'au moins l'un des espaceurs présente l'une des séquences suivantes:

GLY ARG

ou ARG GLY ARG.

5. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce
20 qu'au moins l'un des espaceurs comprend un ou plusieurs acides glutamique et/ou acides aspartique.

6. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les espaceurs intègrent une cystéine ou une chaîne alkyle
25 fonctionnalisée par un groupe thiol et des liaisons non-peptidiques, telles que des liaisons disulfure ou dithioéther.

7. Lipopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les espaceurs comprennent un groupe tel qu'un
groupe thiazolidine, oxime ou hydrazone.

8. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en
30 ce qu'il comprend l'enchaînement :

- d'une partie lipidique,
- d'un premier espaceur,
- d'un épitope T auxiliaire,
- 35 - d'un second espaceur, et

- d'un épitope CTL.

9. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend l'enchaînement :

- d'une partie lipidique,
- d'un premier espaceur,
- d'un épitope T auxiliaire,
- d'un second espaceur,
- d'un premier épitope CTL,
- d'un troisième espaceur, et
- d'un second épitope CTL.

10. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C_{10} à C_{20} , éventuellement ramifiées ou insaturées, ou un dérivé de stéroïde.

11. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend au moins deux chaînes dérivées d'acides gras ou d'alcools gras en C_{10} à C_{20} , liées entre elles par un ou plusieurs acides aminés.

12. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la partie lipidique est constituée de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH_2 d'une lysine.

13. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la partie lipidique comprend un résidu d'acide palmitique, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, de pimélaute ou de trimélaute.

14. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la partie non lipidique comprend entre 15 et 100 acides aminés.

15. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est un épitope multivalent.

16. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est le peptide 830-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

QYIKANSKFIGITE

17. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'épitope T auxiliaire est l'épitope de l'hémagglutinine ou l'épitope PADRE.

5 18. Lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il contient au moins un épitope CTL d'une protéine spécifique du mélanome, d'une protéine du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la protéine p-53 ou d'une protéine du stade intra-hépatocytaire de *Plasmodium Falciparum*.

10 19. Utilisation d'un lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 18 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique.

20. Utilisation d'un lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 18 pour la fabrication d'un médicament pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la p-53 du
15 mélanome, ou de la malaria.

21. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une dose pharmacologiquement efficace d'un ou plusieurs lipopeptides selon l'une des revendications 1 à 18 et des excipients pharmaceutiquement compatibles.

20 22. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs lipopeptides selon l'une des revendications 1 à 18.

1/3

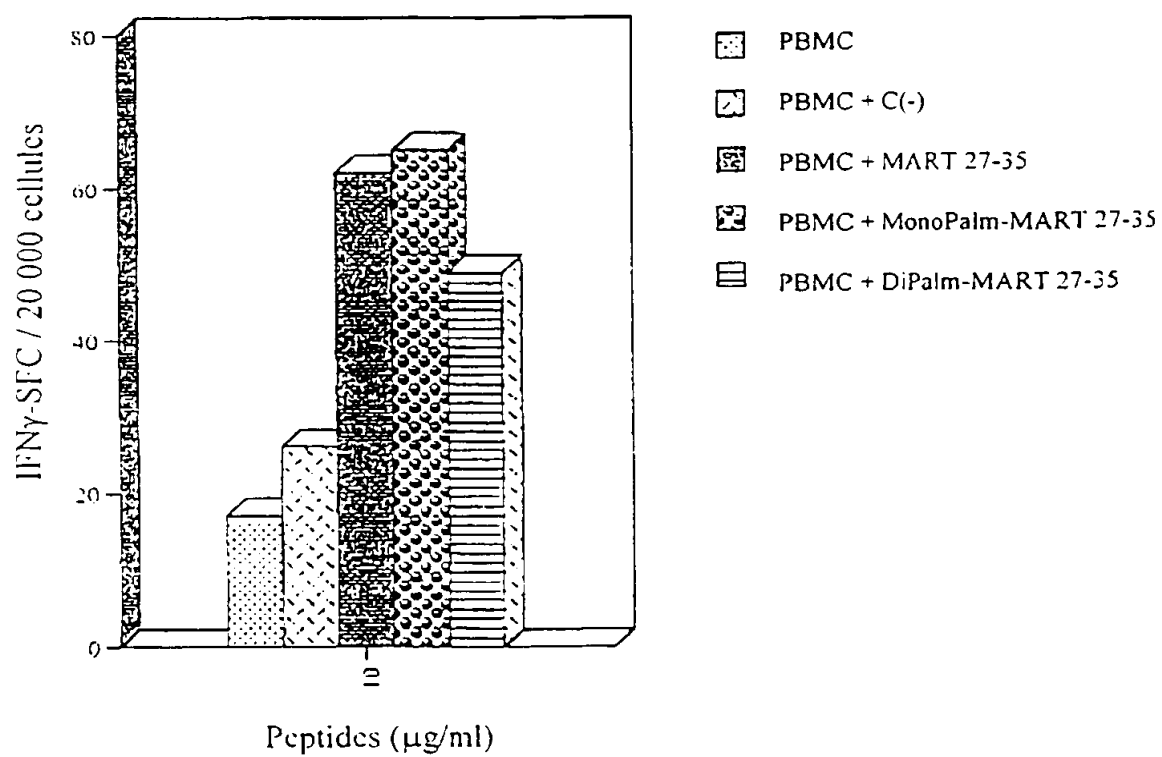


FIGURE 1

2/3

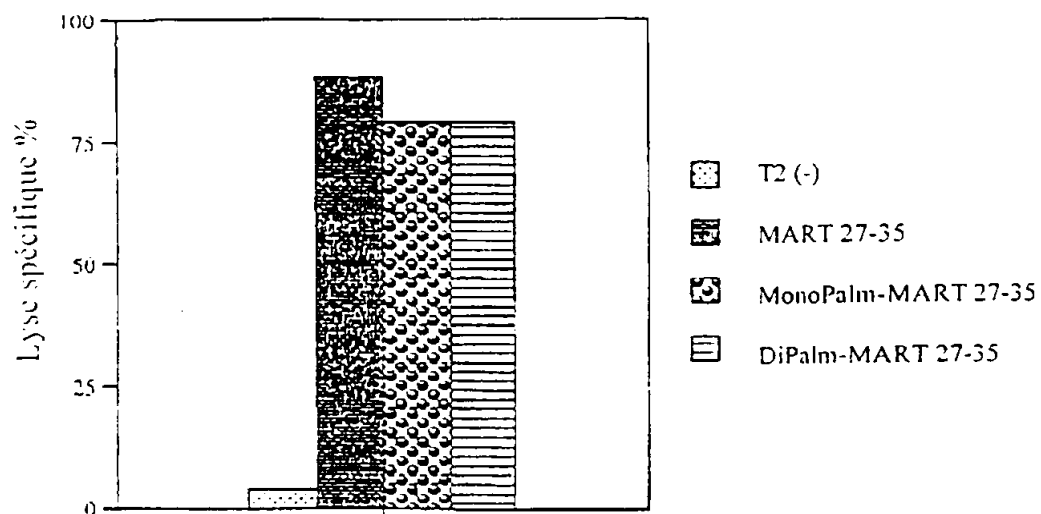


FIGURE 2A

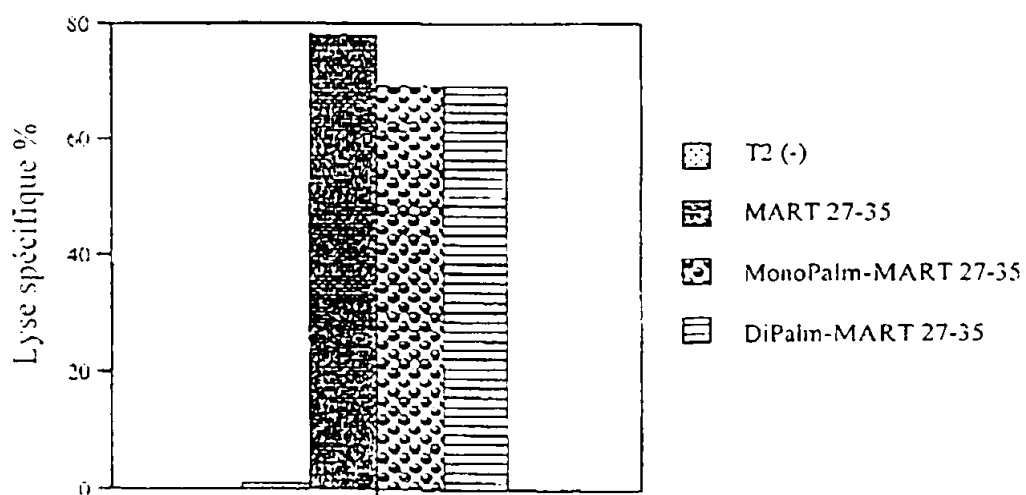


FIGURE 2B

3/3

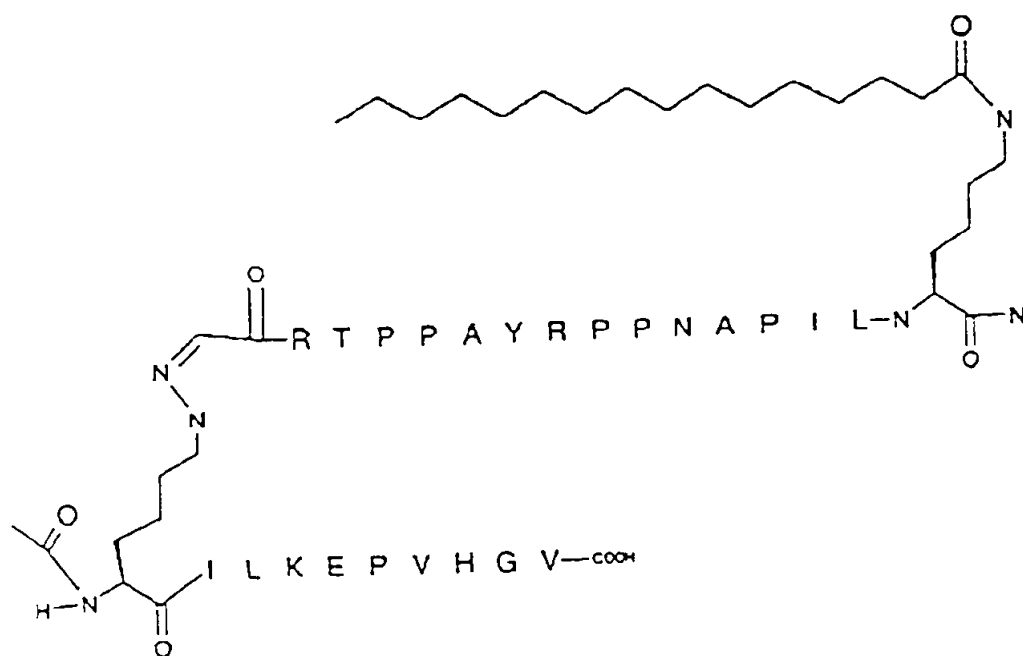


FIGURE 3

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 558101
FR 9804323

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 95 22317 A (CYTEL CORP) 24 août 1995	1-3,8-22
Y	* le document en entier *	1-22
	* page 29 *	
	* page 31 *	
	* page 34 *	
	* page 17; revendications *	
X	VITIELLO A ET AL: "Development of a lipopeptide -based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 1, janvier 1995, pages 341-349, XP002075038	1-3,8-22
Y	* figure 1 *	1-22
Y	GB 2 271 995 A (MERCK & CO INC) 4 mai 1994	1-22
	* le document en entier *	
	* page 2; revendications *	
Y	US 5 637 481 A (LEDBETTER JEFFREY A ET AL) 10 juin 1997	1-22
	* colonne 17, ligne 45 - ligne 60 *	
	* revendication 1 *	
X	J.P. SAUZET ET AL: "Long lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimeric-multirestricted lipopeptides" VACCINE, vol. 13, no. 14, 1995, pages 1339-1345, XP002089324	1-3,8, 10,11, 13,14, 18-22
	* tableau 1 *	
A	EP 0 491 628 A (INST NAT SANTE RECH MED ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 24 juin 1992	
	* le document en entier *	
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 janvier 1999		Cervigni, S
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03 92 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 558101
FR 9804323

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP 0 433 242 A (CESALPINO ANDREA FOND) 19 juin 1991 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche 13 janvier 1999		Examineur Cervigni, S
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou schéma-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1/3

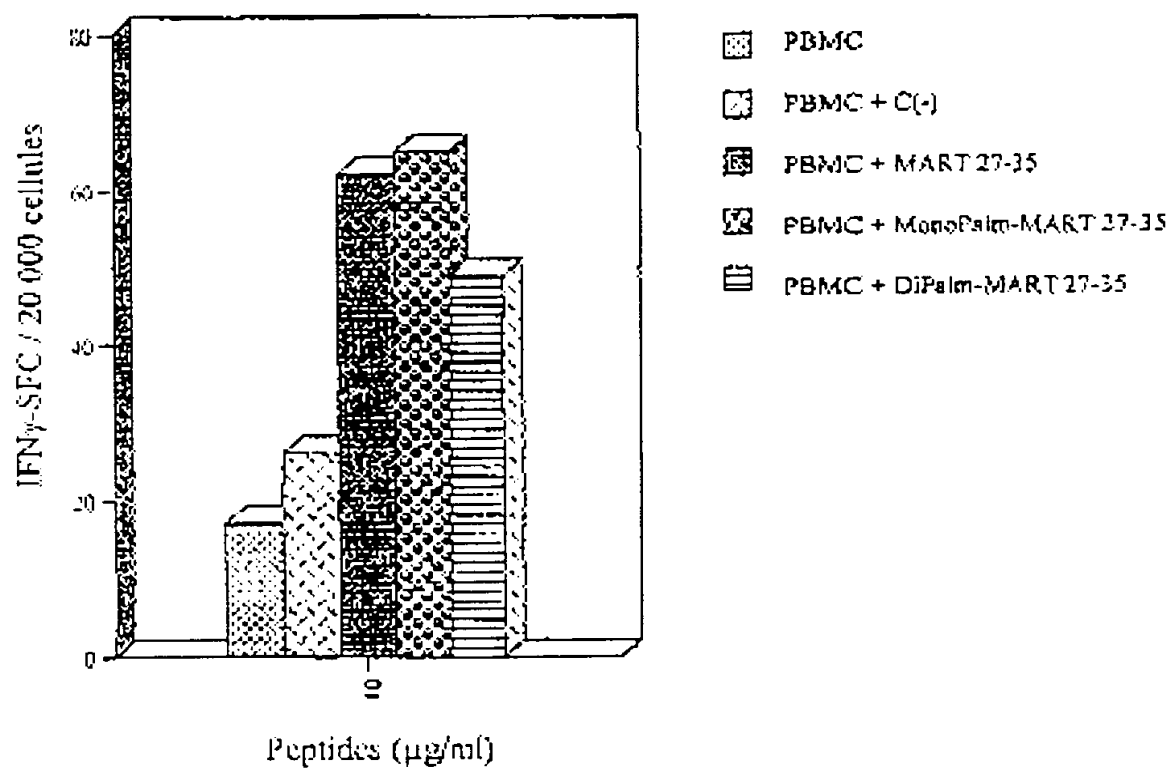


FIGURE 1

2/3

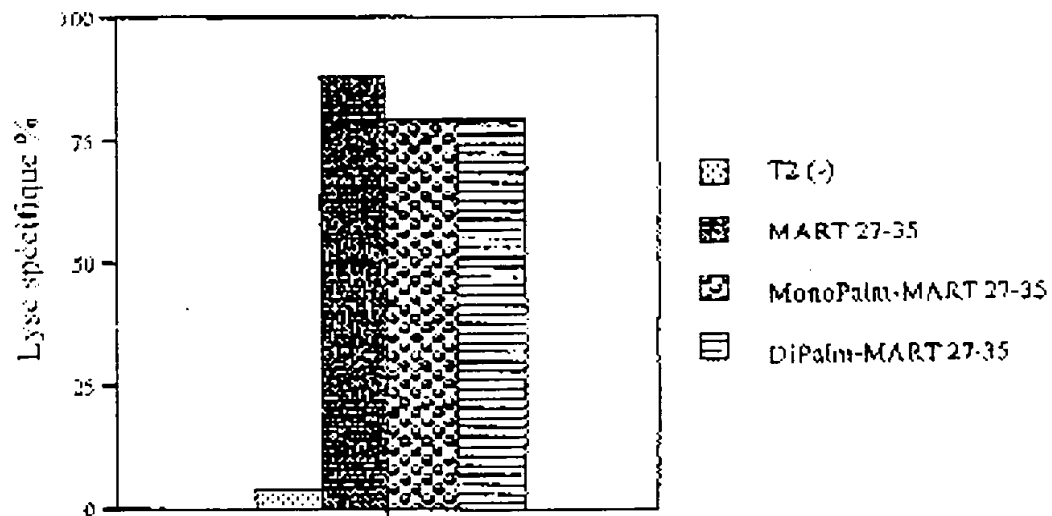


FIGURE 2A

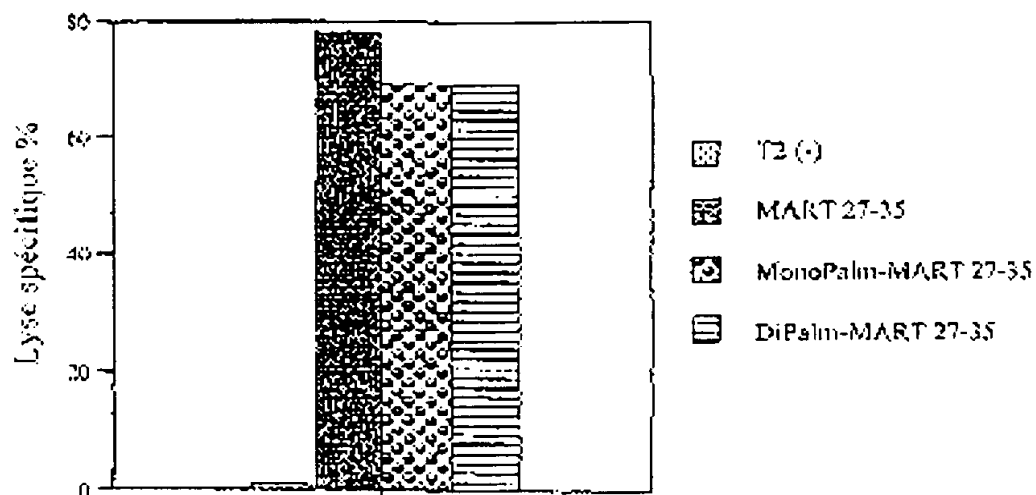


FIGURE 2B

3/3

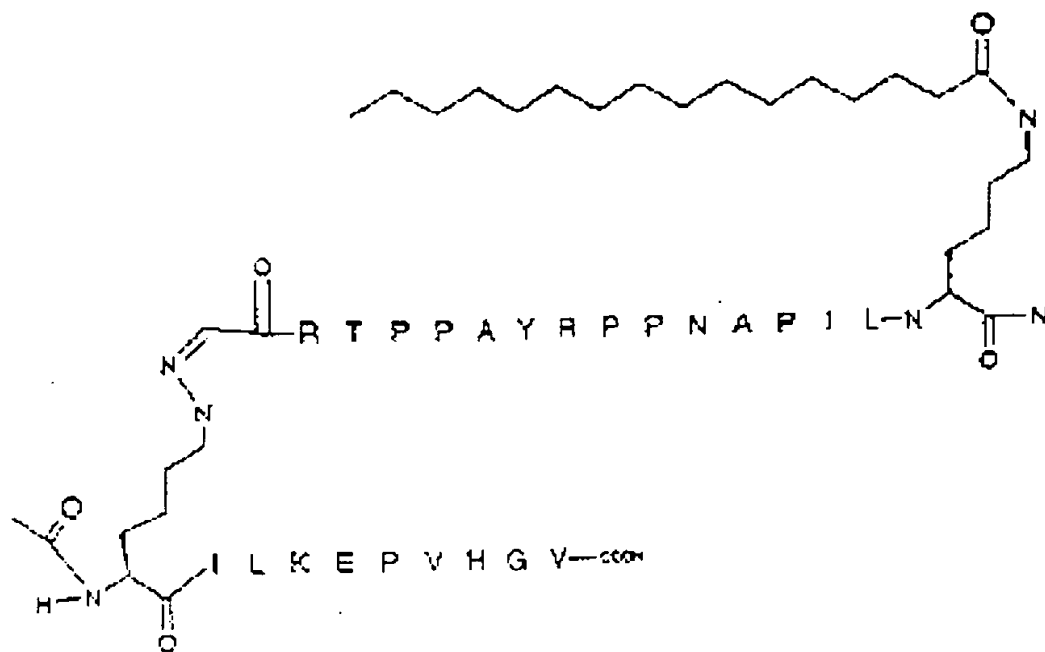


FIGURE 3